

To Select the Appropriate Reference Gene for Normalizing the Quantitative Data to Assess MicroRNAs in Plasma Samples of Patients with Gastric Cancer

Pegah Parvae¹, Mahdieh Mondanizadeh^{2*}, Behzad Khansarinejad³, Amir Nader Emami Razavi⁴

1- MSc in Biotechnology, Department of Biotechnology and Molecular Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Biotechnology and Molecular Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

4- Researcher, Cancer Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 7 May 2016, Accepted: 1 Jun 2016

Abstract

Background: Circulating microRNAs are promising biomarkers in diagnosis and assessment of cancerous patients. Quantitative Real-time PCR assay is a sensitive test for evaluating the levels of miRNAs expression. Nevertheless, there is no concurrence on selecting appropriate reference genes for qPCR analysis of miRNAs in circulation. Therefore, the current study aimed to select a suitable reference gene for normalizing the RT-qPCR assay results in plasma samples of patients with gastric cancer.

Materials and Methods: Based on previously published studies, three molecules SNORD47, U6 RNA, and miR-103 were selected as the candidate reference genes. After RNA extraction from plasma samples of 40 patients with gastric cancer and 40 healthy individuals, expression levels of these molecules were evaluated using Real-time PCR method.

Results: The results showed that the developed assays are able to diagnose their specified targets by a suitable linear range. By comparing patients and control groups, although the expression levels of miR-103 molecule were not equal between the two groups ($p= 0.017$), SNORD47 and U6 RNAs had similar expression levels. However, the variations of SNORD47 expression were lower than U6 RNA.

Conclusion: Based on the results of the current study, the SNORD47 molecule has a stable expression levels in plasma samples of patients with gastric cancer and normal individuals and can be used as an appropriate reference gene for normalizing the quantitative data of qPCR assay.

Keywords: Gastric cancer, miRNAs, RT-qPCR, Reference gene

*Corresponding Author:

Address: Department of Biotechnology and Molecular Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Email: M_mondanizadeh@yahoo.com

انتخاب ژن رفرانس مناسب جهت نرمالیزه کردن داده های کمی سنجش میکرو RNAها در نمونه پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده

پگاه پروایی^۱، مهدیه موندنی زاده^{۲*}، بهزاد خوانساری نژاد^۳، امیرنادر امامی رضوی^۴

۱- کارشناسی ارشد زیست فن آوری، گروه زیست فن آوری و پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۲- استادیار، گروه زیست فن آوری و پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۳- استادیار، گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۴- محقق، انستیتو سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: میکرو RNA های موجود در گردش خون بیومارکرهایی امیدبخش برای تشخیص و ارزیابی بیماران مبتلا به سرطان می باشد. آزمون واکنش زنجیره ای پلی مرز کمی زمان واقعی (RT-qPCR) روشی حساس برای برآورد میزان بیان میکرو RNA ها است. با این وجود، در حال حاضر هیچ توافقی برای انتخاب ژن های رفرنس مناسب برای آنالیزهای qPCR بر روی میکرو RNA در گردش خون وجود ندارد. از این رو، هدف از این مطالعه انتخاب ژن رفرنس مناسب جهت نرمالیزه کردن نتایج RT-qPCR در نمونه های پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان معده بوده است.

مواد و روش ها: بر اساس مطالعات پیشین سه مولکول SNORD47، U6 و miR-103 به عنوان ژن رفرنس منتخب مورد بررسی قرار گرفتند. بدین ترتیب بعد از استخراج از نمونه های پلاسمای ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان معده و ۴۰ نفر سالم، سطوح بیان این مولکول ها به روش Real-time PCR ارزیابی شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که تست های طراحی شده قادر به تشخیص حساس اهداف تعیین شده در یک دامنه خطی مناسب می باشند. بر اساس مقایسه دو گروه افراد بیمار و سالم، اگرچه میزان بیان مولکول miR-103 بین دو گروه یکسان نبود ($p=0/017$)، RNA های SNORD47 و U6 دارای تغییرات سطوح بیانی مشابه بودند. با این وجود تغییرات در بیان مولکول SNORD47 کمتر از مولکول U6 بود.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مولکول SNORD47 دارای سطوح بیانی پایداری در نمونه پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم است و می تواند به عنوان یک ژن رفرانس مناسب جهت نرمالیزه کردن داده های کمی تست qPCR مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان معده، میکرو RNA، RT-qPCR، ژن رفرنس

*نویسنده مسئول: ایران، اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه زیست فن آوری و پزشکی مولکولی

Email: m_mondanizadeh@yahoo.com

مقدمه

سرطان یکی از معضلات جدی در جوامع امروزی می باشد، به طوری که بعد از بیماری های قلبی عروقی دومین جایگاه مرگ و میر در دنیا را به خود اختصاص داده است (۱). در بین سرطان های مختلف، سرطان معده به عنوان چهارمین بیماری بدخیم انسانی و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان، سالانه حدود ۸۰۰ هزار نفر را به کام مرگ می کشاند (۲، ۳). سرطان معده معمولاً یک بیماری بدون علامت است و تنها با بررسی های دقیق و مکرر در افراد در معرض خطر قابل تشخیص است. در افراد مبتلا به این بیماری در بیش از نیمی از حالات پیشرفته، هیچ علامتی مشاهده نمی شود و سرطان هنگامی تشخیص داده می شود که وارد مرحله پیشرفته گردد و بسیاری از این افراد پس از مدت کوتاهی جان خود را از دست می دهند. این در حالی است که تشخیص سریع و به موقع این بیماری می تواند میزان بقای ۵ ساله افراد مبتلا را تا ۶۰ درصد افزایش دهد. روش های میکروسکوپی و اندوسکوپی که امروزه برای تشخیص سرطان معده استفاده می شوند، روش هایی تهاجمی محسوب می گردند که متأسفانه این روش ها برای غربالگری های روتین مناسب نمی باشند. بنابراین نیاز به بیومارکری که توانایی تشخیص بیماری را در مراحل اولیه و به صورت سریع، ساده و با حساسیت و اختصاصیت بالا داشته باشند، به شدت احساس می شود (۴). امروزه بسیاری از تحقیقات در مبحث سرطان بر روی عوامل مولکولی به نام میکرو RNA متمرکز شده است. تاکنون تحقیقات متعددی تغییر بیان این عوامل ژنتیکی را در انواع متفاوتی از تومور نشان می دهند (۵). میکرو RNA ها، RNA های کوچک تک رشته ای و غیر کدکننده با طول ۱۹ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که با اتصال از طریق ناحیه ۷ نوکلئوتیدی در انتهای ۵' خود به نام seed به قسمت 3'-UTR در mRNA هدف به صورت ناقص یا کامل سبب تجزیه یا جلوگیری از ترجمه ی آن می شوند و نقش بسیار مهمی در فرآیند تنظیم بیان ژن دارند (۶). در طی ۱۰ سال گذشته نقش این عوامل ژنتیکی در بسیاری از فرآیندهای زیستی نظیر تمایز، نمو، پاسخ های

استرسی، آپوپتوز و تکثیر نشان داده شده است (۷). در واقع، مشخص شده که میکرو RNA ها می توانند به عنوان یک انکوژن و یا سرکوبگر تومور در ایجاد سرطان های مختلف ایفای نقش نمایند (۸). بدین ترتیب تغییرات بیان این عوامل ژنتیکی که بسته به نوع هر تومور متفاوت می باشند، فرصتی منحصر به فرد را در استفاده از آن ها برای تشخیص سرطان فراهم می آورد (۹). به عنوان مثال تحقیقات نشان داده اند که افزایش میزان بیان mir-9 (۱۰) و mir-21 (۱۱، ۱۲) به ترتیب با سرطان معده و سرطان کولون و کاهش میزان بیان mir-34 (۱۳) و mir-449a (۱۴) به ترتیب با سرطان ریه و پروستات همراه می باشند. امروزه تحقیقات مختلفی حضور میکرو RNA ها را در حالات فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی متعددی از جمله سرطان در پلاسما نشان داده اند و مشخص شده که میکرو RNA هایی که در ایجاد و پیشرفت تومور نقش دارند از پایداری قابل ملاحظه ای در خون و پلاسما برخوردار می باشند (۱۵). بدین ترتیب سهولت دسترسی به نمونه و پایداری حضور آن ها در پلاسما امکان استفاده از این عوامل مولکولی را به عنوان یک بیومارکر غیر تهاجمی فراهم آورده است. از سویی دیگر، مطالعات حاکی از وجود پروفایل اختصاصی بیانی میکرو RNA ها در هر تومور در خون می باشد (۱۶، ۱۷). از این رو با استفاده از این یافته ها می توان تشخیص هر سرطان را با اندازه گیری میکرو RNA های مخصوص آن تومور در خون با استفاده روش های مولکولی از جمله Real-time PCR کمی (qRT-PCR) انجام داد. تکنیک qRT-PCR، روشی مناسب برای تعیین کمیّت و میزان بیان ژن ها بوده که نتایج آن از صحت و دقت بالاتری نسبت به روش های پیشین برخوردار است و به عنوان یکی از متداول ترین روش ها برای اندازه گیری میکرو RNA های موجود در پلاسما محسوب می گردد (۱۸). از مهم ترین مزیت های این تکنیک می توان به حساسیت و کمیّت سنجی دقیق آن نسبت به سایر روش ها اشاره کرد. در مطالعات آنالیز بیان ژن، نرمال سازی نمونه های آزمایشی جهت کاهش خطای نمونه برداری بسیار با اهمیت می باشد. به طوری که نرمال سازی به عنوان یکی از اجزای ضروری روش qRT-

miRNAها در سرطان معده است تا بتوان ژن رفرنس مناسب را در آنالیزهای بیان miRNAها در افراد مبتلا به سرطان معده تعیین نمود.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه پلاسما

در این مطالعه تجربی ۲ میلی لیتر از نمونه پلاسما ۴۰ نفر بیمار مبتلا به سرطان معده که بیماری آنها از قبل با اندوسکوپی مورد تأیید قرار گرفته بود و تحت تاثیر هیچ گونه شیمی درمانی، پرتو درمانی و عمل جراحی قرار نگرفته بودند، از بانک تومور ایران خریداری شد و ۲ میلی لیتر از نمونه پلاسما ۴۰ نفر فرد سالم به عنوان گروه کنترل (نمونه گروه کنترل از بین زوجین مراجعه کننده به آزمایشگاه پیش از ازدواج مرکز بهداشت شهر اراک شهرستان انتخاب شد که نتیجه آزمایشهای آنها طبیعی بود و نیز سابقه بیماری گوارشی مزمن نداشتند) تهیه گردید. لازم به ذکر است نمونهها تا زمان انجام آزمایشات در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. از همه شرکت کنندگان رضایت نامه کتبی دریافت گردید.

انتخاب ژن های رفرنس و طراحی

الیگونوکلوئوتیدها

در این بررسی، بر اساس دادههای منتشر شده و مقالات پیشین ژنهای miR-103، SNORD47 و U6 به عنوان ژنهای رفرنس انسانی برای نرمال سازی مقادیر کمی برگزیده شدند (۲۰). طراحی پرایمرهای ساقه-حلقه به منظور سنتز c-DNA و پرایمرهای اختصاصی qRT-PCR برای بررسیهای کمی بیان ژنهای منتخب با کمک نرم افزارهای AlleleID6، GeneRunner، Oligo6 و mfold (برای بررسی ساختارهای ثانویه) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ و ۲ ذکر شده است.

PCR به حساب می آید و استفاده از یک ژن رفرنس به عنوان کنترل داخلی یکی از معمولترین شیوهها برای نرمال سازی محسوب می شود. در واقع، در روش qRT-PCR، میزان بیان ژن مورد نظر نسبت به یک ژن رفرنس داخلی که فرض می شود در همه سلولها در افراد سالم و بیمار میزان بیان ثابتی داشته و تحت تاثیر شرایط آزمایش و بیماری قرار نمی گیرد، مقایسه می شود. در صورت نقض این فرض، نرمال سازی نمونههای آزمایشی تحت تاثیر قرار گرفته و ممکن است سبب ایجاد خطا در تعیین نتایج آزمایش شود. به این صورت که نوسانات تصادفی بیان ژنهای رفرنس در بین نمونهها سبب می شود که تعیین اختلافات اندک بین ژنهای هدف امکان پذیر نگردد. هم چنین در صورت تاثیر گذاری شرایط آزمایشگاهی و بیماری بر روی این ژنها، فرآیند نرمال سازی با مشکل مواجه می شود (۱۹). علاوه بر این، میزان بیان ژنهای رفرنس به عنوان عاملی برای نرمال سازی بیان ژنها در تکنیک qRT-PCR باید با کمک آزمایشات تجربی برای بافت های خاص، انواع نمونهها و برای هر فرد مورد اعتبار سنجی قرار گیرد. بنابراین انتخاب ژن رفرنس مناسب جهت انجام آزمونهای qRT-PCR در مطالعات انجام شده در بیماران مبتلا به سرطان معده از اهمیت به سزایی برخوردار است. برخی از مطالعات که اخیراً بر روی نمونه بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان معده صورت گرفته است نشان دهنده ثبات بیان miR-103 در بین افراد سالم و مبتلایان به سرطان معده است، در حالی که بعضی از مطالعات دیگر حاکی از تغییرات بیان miR-103 در این بیماران نسبت به افراد کنترل می باشد. از سوی دیگر، برخی از RNAهای کوچک هم چون SNORD47 و U6 نیز به عنوان ژن های رفرنس به کار گرفته شده اند.

از این رو، هدف مطالعه حاضر بررسی تغییرات بیان miR-103، SNORD47 و U6 RNA در نمونه پلاسما افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم به منظور تعیین یک ژن مناسب جهت بررسی تغییرات بیان

جدول ۱. توالی پرایمرهای ساقه-حلقه طراحی شده برای ژن های **mir-103**، **SNORD47** و **U6**

(در انتهای ۵ این پرایمرها یک ساختار ساقه-حلقه وجود دارد و این ناحیه انتهایی پرایمر به صورت عمومی طراحی شده است، در حالی که انتهای ۳ این پرایمرها به صورت کاملاً اختصاصی برای miRNA مربوطه طراحی می‌گردد)

ژن	توالی پرایمر
mir-103	5'-GTCGTATCGAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTCGATACGACCAAGGCA-3'
SNORD47	5'-GTCGTATCGAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACAACCTCA-3'
U6	5'-GTCGTATCGAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTCGATACGACAAAATAT-3'

جدول ۲. توالی پرایمرهای اختصاصی **Real-Time PCR**برای بررسی های کمی بیان **mir-103**، **SNORD47** و **U6**

ژن	توالی پرایمر
mir-103	F: 5'-GCTTCTTTACAGTGCTGCC-3' R: 5'-AGAGCAGGGTCCGAGGT-3'
SNORD47	F: 5'-ATCACTGTAAAACCGTTCCA-3' R: 5'-AGAGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' R: 5'-AGAGCAGGGTCCGAGGT-3'

تبدیل میکرو RNA استخراج شده به cDNA

در این مرحله ابتدا مقدار ۵ میکرولیتر از میکرو RNA استخراج شده را با ۰/۷۵ میکرولیتر از پرایمر ساقه-حلقه و مقدار ۱/۷۵ میکرولیتر آب فاقد RNase مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد انکوبه کرده و سپس مقدار ۱ میکرولیتر از بافر 10 X RT و ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم ترانس کیرپتاز معکوس M-MuLV (ویوانتیس) را به آن اضافه کرده و مطابق با برنامه دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه و ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر قرار دادیم. c-DNA های سنتز شده بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای آزمایشات بعدی ذخیره شد.

بررسی کمی میزان بیان ژن های **mir-103****U6** و **SNORD47**

واکنش qRT-PCR در دستگاه Light cycle 96 (روشه، آلمان) همراه با مانیتور، نرم افزار و رک های اختصاصی (روشه، آلمان) و با سه بار تکرار صورت پذیرفت. در این واکنش مقدار ۷/۵ میکرولیتر از SYBR® (1 X) PremixExTaq™ II با مقدار ۰/۴۵ میکرولیتر از پرایمر سنس، ۰/۴۵ میکرولیتر پرایمر آنتی سنس (همگانی) و ۱/۵ میکرولیتر DNA (c-DNA) الگو به همراه ۵/۱ میکرولیتر آب فاقد RNase مخلوط گردید. برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در سه مرحله زیر تنظیم گردید:

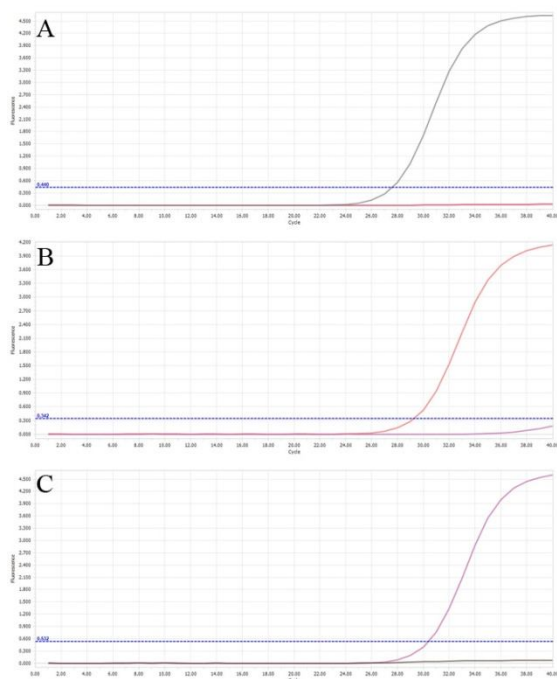
۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به منظور واسرشت سازی اولیه مولکول cDNA، سپس ۴۰ سیکل شامل ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد جهت واسرشت

استخراج میکرو RNA ها از پلاسما

استخراج میکرو RNA ها از پلاسما با استفاده از کیت RNX Plus (سیناکلون-ایران) انجام شد. مراحل انجام کار مطابق با دستورالعمل موجود در کیت صورت پذیرفت. به طور خلاصه، ۱ میلی لیتر محلول RNX Plus بر روی ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما سانتریفیوژ شده، افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس، بعد از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به محتویات فوق، انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. بعد از سانتریفیوژ در ۴ درجه سانتی گراد، محلول رویی (فاز آبی) جدا سازی و به دو برابر حجم آن اتانول مطلق سرد اضافه گردید. بعد از قرار دادن نمونه ها به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت. در نهایت رسوب حاصله در ۴۰ میکرولیتر آب فاقد RNase-DNase حل شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد برای مطالعات بعدی نگهداری گردید.

به منظور محاسبه غلظت و خلوص miRNA استخراج شده، نسبت A260/A280 با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (اپندورف) محاسبه گردید.

نتایج حاصل از تکثیر محصولات هر یک از اهداف miR-103 و SNORD 47، U6 را نشان می دهد.



شکل ۱. نتایج حاصل از واکنش Real-time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی miR-103 (A)، SNORD47 (B) و U6 (C) (نقطه آستانه به صورت خط افقی و نمودار تکثیر نمونه مثبت و کنترل منفی در شکل نشان داده شده است).

به منظور تعیین توانایی تشخیص اهداف مورد بررسی توسط الیگونوکلئوتیدها در بازه‌ای از غلظت‌های مختلف الگو، اقدام به تولید یک منحنی از غلظت‌های ۱۰۰، ۱۰، ۱ و ۰/۱ نانوگرم از cDNA شد. سپس هر غلظت با ۳ تکرار با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر مولکول مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌گونه که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد، بر اساس نتایج حاصل از آنالیز رگرسیون خطی، تست‌های طراحی شده برای هر سه مولکول مورد بررسی، دارای کارایی مناسب جهت تشخیص اهدافشان در دامنه‌ای از غلظت‌های مختلف می‌باشند.

سازی، ۱۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها و ۱۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور طولی سازی.

هم‌چنین پس از پایان یافتن سیکل‌ها، منحنی ذوب نمونه‌ها به منظور تعیین خلوص آن‌ها در بازه دمایی ۶۵ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد رسم شد.

تحلیل آماری

تعیین دامنه تشخیصی آزمون‌های طراحی شده برای هر الگو با استفاده از آنالیز رگرسیون خطی صورت پذیرفت. به منظور بررسی تغییرات بیان از ضریب تغییرات شاخص‌های Cq و نیز تست آماری تی تست استیوندت استفاده شد. تعیین نرمال بودن داده‌ها در گروه‌های متغیر مستقل با استفاده از تست کولموگروف-اسمیرنف صورت پذیرفت. کلیه تحلیل‌ها به وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و سطح معنی داری کوچک‌تر از ۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نمونه‌ها و بیماران

در مجموع، ۴۰ نمونه از افراد سالم به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند که از این تعداد، ۲۰ مورد مذکر و ۲۰ مورد مونث بودند. میانگین سنی افراد این گروه ۲۸ سال بود (دامنه ۲۶ تا ۳۸ سال). در مقابل از مجموع ۴۰ بیمار، تعداد ۱۷ (۴۲/۵ درصد) بیمار مونث و ۲۳ (۵۷/۵ درصد) بیمار مذکر بودند. میانگین سنی افراد در این گروه ۴۹ سال (دامنه ۲۸ تا ۶۸ سال) بود.

بررسی صحت عملکرد روش RT-qPCR

به منظور بررسی صحت عملکرد الیگونوکلئوتیدهای طراحی شده، آزمون Real-time PCR با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای اختصاصی بر روی هر الگو انجام گرفت و پس از مشاهده محصولات اختصاصی و افتراق آن‌ها از دایمرهای پرایمر با استفاده از آنالیز منحنی ذوب اقدام به بهینه سازی شرایط واکنش گردید. شکل ۱

Cq های مولکول miR-103 در بین گروه مبتلایان به سرطان معده نسبت به گروه کنترل پایین تر بود (شکل ۲). از سوی دیگر، میزان تغییرات بیان در گروه بیماران و کنترل نیز به وسیله ضریب تغییرات محاسبه گردید. بر این اساس میزان تغییرات شاخص های Cq مولکول U6 در گروه های بیماران و کنترل به ترتیب ۵/۰۸ درصد و ۵/۵۶ درصد محاسبه گردید. به طور مشابه ضریب تغییرات محاسبه شده برای SNORD47 در این دو گروه ۴/۱ و ۱/۵۵ درصد بود.

Independent Samples Test for SNORD47

A		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means
		F	Sig.	Sig. (2-tailed)
Cqs	Equal variances assumed	4.885	.033	.440
	Equal variances not assumed			.353

Independent Samples Test for U6 RNA

B		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means
		F	Sig.	Sig. (2-tailed)
Cqs	Equal variances assumed	3.196	.082	
	Equal variances not assumed			

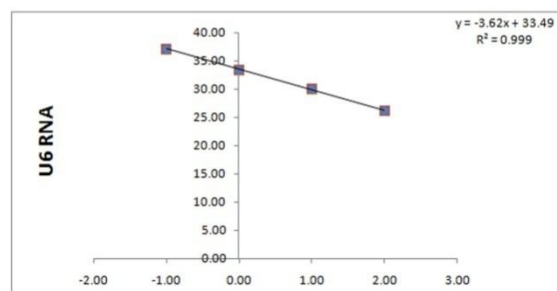
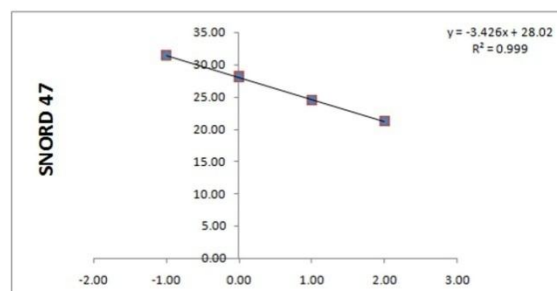
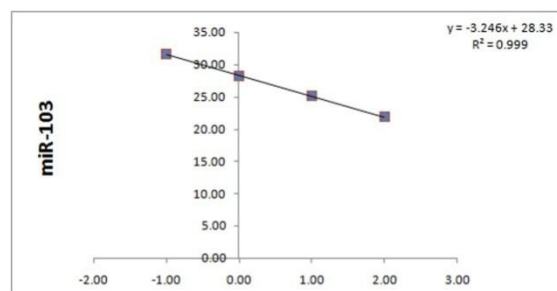
Independent Samples Test for miR-103

C		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means
		F	Sig.	Sig. (2-tailed)
Cqs	Equal variances assumed	15.374	.000	.035
	Equal variances not assumed			.017

شکل ۳. ارزیابی تغییرات بیان اهداف RNA مورد بررسی در بین افراد سالم و مبتلایان به سرطان معده. (A) تغییرات SNORD47، (B) مولکول U6 و (C) تغییرات بیان miR-103

بحث

یکی از معیارهای مهم به منظور انتخاب ژن رفرنس، اندازه قابل مقایسه آن با اهداف مورد مطالعه است. بر این اساس به منظور نرمال کردن داده های کمی میکرو RNA ها، باید از RNAهایی با اندازه کوچک استفاده نمود (۲۱). از این رو، با توجه به درک اهمیت روز افزون نقش میکرو RNA ها در توسعه و نیز تشخیص سرطان های مختلف از جمله سرطان معده، هدف این مطالعه انتخاب RNA رفرنس مناسب جهت نرمال کردن داده های کمی ناشی از بیان miRNA ها در نمونه پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان معده بود. بر اساس مرور مقالات مختلف، سه مولکول



شکل ۲. بررسی خطی بودن تست های به کار گرفته شده جهت تشخیص اهداف مورد بررسی.

(ضرایب تعیین رگرسیون و شیب خط معادله رگرسیون در قسمت بالا و سمت راست هر تصویر نشان داده شده است).

بررسی نوسانات سطوح بیانی RNA های مورد بررسی در بیماران و افراد کنترل

به منظور بررسی تغییرات بیان اهداف مورد نظر در بین افراد سالم و مبتلایان به سرطان معده، مقدار ۱ میکروگرم cDNA در هر واکنش qPCR دوبار مورد آزمایش قرار گرفت و شاخص های Cq بین گروه بیماران و کنترل مقایسه شدند. همان گونه که در شکل ۳ ملاحظه می گردد، بر اساس نتایج حاصل از مقایسه دو گروه به وسیله آزمون تی تست، میزان بیان RNA های SNORD47 ($p=0/353$) و U6 ($p=0/198$) دارای تغییرات بیان معنی دار بین گروه بیمار و کنترل نبود. از سوی دیگر بیان مولکول miR-103 بین دو گروه یکسان نبود ($p=0/017$) و بر این اساس شاخص

هر گروه مشخص نمود که تغییرات در مولکول SNORD47 کمتر از مولکول U6 می باشد.

نتیجه گیری

بر اساس یافته های مطالعه حاضر، هر دو مولکول SNORD47 و U6 دارای سطوح بیانی پایداری در نمونه پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم هستند و از این رو می توانند به عنوان ژن رفرنس مناسب در نرمال کردن ارزیابی های کمی سطوح بیانی میکرو RNAها به کار گرفته شوند. با این وجود، به نظر می رسد مولکول SNORD47 به علت نوسانات کمتر بیانی و شاخص های Cq پایین تر از ارجحیت بیشتری برخوردار باشد. به علاوه امکان استفاده از مولکول miR-103 به عنوان ژن رفرنس مورد تأیید قرار نگرفت، چراکه نشان داده شد این مولکول در مبتلایان به سرطان معده دستخوش افزایش بیان می گردد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه علوم پزشکی اراک می باشد که هزینه آن توسط معاونت تحقیقات و فن آوری تأمین گردیده است. بدین وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را از همکاران مرکز تومور بانک ایران و نیز آزمایشگاه میکروبیولوژی مولکولی و ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی اراک به ویژه خانم ندا مولایی اعلام می دارند.

منابع

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011; 61(2):69-90.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. CA: a cancer journal for clinicians. 2008; 58(2):71-96.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians. 2005; 55(2):74-108.
4. Hundt S, Haug U, Brenner H. Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2007; 16(10):1935-53.

SNORD47، U6 و miR-103 از جمله فراوان ترین RNAهای رفرنس استفاده شده در نرمال کردن داده های میکرو RNAها در پلازما و سرم بودند که از این رو در مطالعه حاضر مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی الگوهای cDNA در غلظت های مختلف با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای طراحی شده نشان داد که هر سه تست قادر به تشخیص خطی دامنه ای از غلظت های مختلف الگو در یک نمونه بالینی می باشند. نتایج حاصل از بررسی کمی شاخص های Cq در بین نمونه های بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد کنترل نشان داد که سطوح بیانی مولکول miR-103 دارای تفاوت بیان در دو گروه می باشد. به طور دقیق تر بر اساس نتایج آزمون آماری تی تست استیودنت میانگین شاخص های Cq در گروه بیماران معادل $26/07$ ($SD=1/9$) و در افراد کنترل $28/4$ ($SD=1/35$) محاسبه شد که این یافته از نظر آماری معنی دار بود ($p=0/017$). این یافته نشان می دهد که مولکول miR-103 در بیماران مبتلا به سرطان معده خود دستخوش افزایش بیان می شود و از این رو نمی توان از آن به عنوان یک ژن رفرنس به در آزمون RT-qPCR استفاده نمود. اگرچه این یافته با برخی از مطالعاتی که افزایش بیان miR-103 را در مدل های حیوانی دارای سرطان معده گزارش نموده اند تطابق دارد (۲۲)، اما با برخی از مطالعات پیشین که miR-103 را به عنوان نرمال کننده سطوح بیانی میکرو RNAها در پلازما معرفی نمودند مغایر است (۲۳، ۲۴). از جمله سانگ و همکاران در پژوهشی مشابه در سال ۲۰۱۱ در چین عنوان نمودند که سطح بیانی مولکول miR-103 در سرم افراد سالم و مبتلایان به سرطان معده تقریباً یکسان است (۲۰)، این در صورتی است که نتایج پژوهش حاضر این یافته را نقض می کند. از سوی دیگر، نتایج این مطالعه نشان داد که بیان دو مولکول SNORD47 و U6 در دو گروه جمعیت مورد مطالعه یکسان و فاقد تغییرات معنی دار می باشد (شاخص p به ترتیب معادل $0/353$ و $0/198$). این یافته با برخی از مطالعات قبلی که از سطوح بیانی این دو RNA جهت نرمال کردن داده های کمی سنجش میکرو RNAها در سرم یا پلازما استفاده نموده اند هم سو است (۶، ۲۵). نتایج ارزیابی ضرایب تغییرات داده ها در

5. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5):843-54.
6. Mondanizadeh M, Arefian E, Mosayebi G, Saidijam M, Khansarinejad B, Hashemi SM. MicroRNA-124 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sp1 mRNA. *Journal of cellular biochemistry*. 2015; 116(6):943-53.
7. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014; 15(8):509-24.
8. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in molecular medicine*. 2014;20(8):460-9.
9. Ren A, Dong Y, Tsoi H, Yu J. Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015; 16(2):2810-23.
10. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature cell biology*. 2010; 12(3):247-56.
11. Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge C, Ramos K, Colburn N, et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*. 2008;27(31):4373-9.
12. Allgayer H. Pcd4, a colon cancer prognostic that is regulated by a microRNA. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2010;73(3):185-91.
13. Kasinski AL, Slack FJ. miRNA-34 prevents cancer initiation and progression in a therapeutically resistant K-ras and p53-induced mouse model of lung adenocarcinoma. *Cancer research*. 2012; 72(21):5576-87.
14. Noonan EJ, Place RF, Basak S, Pookot D, Li L-C. miR-449a causes Rb-dependent cell cycle arrest and senescence in prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2010; 1(5):349-58.
15. Zhou X, Zhu W, Li H, Wen W, Cheng W, Wang F, et al. Diagnostic value of a plasma microRNA signature in gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Scientific reports*. 2015; 5:11251-2.
16. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011; 8(8):467-77.
17. Song JH, Meltzer SJ. MicroRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of gastroesophageal cancers. *Gastroenterology*. 2012; 143(1):35-47.
18. Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano AE, Hoon DS. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clinical chemistry*. 2011; 57(1):84-91.
19. Kreth S, Heyn J, Grau S, Kretschmar HA, Egensperger R, Kreth FW. Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro-oncology*. 2010; 12(6):570-9.
20. Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Digestive diseases and sciences*. 2012; 57(4):897-904.
21. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *Rna*. 2008; 14(5):844-52.
22. Rotkrua P, Shimada S, Mogushi K, Akiyama Y, Tanaka H, Yuasa Y. Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using a mouse model. *British journal of cancer*. 2013; 108(4):932-40.
23. Wang Y, Tang N, Hui T, Wang S, Zeng X, Li H, et al. Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR analysis of plasma microRNAs levels in rats with acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Journal of Applied Toxicology*. 2013; 33(11):1330-6.
24. Serafin A, Foco L, Blankenburg H, Picard A, Zanigni S, Zanon A, et al. Identification of a set of endogenous reference genes for miRNA expression studies in Parkinson's disease blood samples. *BMC research notes*. 2014; 7(1):1-2.
25. Galiveti CR, Rozhdestvensky TS, Brosius J, Lehrach H, Konthur Z. Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. *Rna*. 2010; 16(2):450-61.